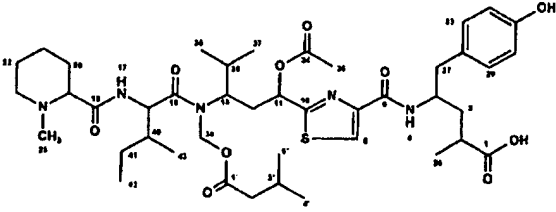



PCT WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
 Internationales Büro
 INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
 INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

<p>(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : C07K 5/078, C12P 1/04, C12R 1/01, A61K 38/05, C12N 1/20 // (C12P 1/04, C12R 1:01)</p>	A1	<p>(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 98/13375</p> <p>(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 2. April 1998 (02.04.98)</p>		
<table style="width: 100%; border: none;"> <tr> <td style="width: 50%; vertical-align: top; padding: 5px;"> <p>(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP97/05095</p> <p>(22) Internationales Anmeldedatum: 17. September 1997 (17.09.97)</p> <p>(30) Prioritätsdaten: 196 38 870.8 23. September 1996 (23.09.96) DE</p> <p>(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): GESELLSCHAFT FÜR BIOTECHNOLOGISCHE FORSCHUNG MBH (GBF) [DE/DE]; Mascheroder Weg 1, D-38124 Braunschweig (DE).</p> <p>(72) Erfinder; und</p> <p>(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): REICHENBACH, Hans [DE/DE]; Mascheroder Weg 1, D-38124 Braunschweig (DE). HÖFLE, Gerhard [DE/DE]; Mascheroder Weg 1, D-38124 Braunschweig (DE). SASSE, Florenz [DE/DE]; Mascheroder Weg 1, D-38124 Braunschweig (DE). STEIN- METZ, Heinrich [DE/DE]; Mascheroder Weg 1, D-38124 Braunschweig (DE).</p> <p>(74) Anwälte: BOETERS, Hans, D. usw.; Boeters & Bauer, Bereiteranger 15, D-81541 München (DE).</p> </td> <td style="width: 50%; vertical-align: top; padding: 5px;"> <p>(81) Bestimmungsstaaten: AL, AM, AT, AU, AZ, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, HU, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, ARIPO Patent (GH, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG).</p> <p>Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i></p> </td> </tr> </table>			<p>(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP97/05095</p> <p>(22) Internationales Anmeldedatum: 17. September 1997 (17.09.97)</p> <p>(30) Prioritätsdaten: 196 38 870.8 23. September 1996 (23.09.96) DE</p> <p>(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): GESELLSCHAFT FÜR BIOTECHNOLOGISCHE FORSCHUNG MBH (GBF) [DE/DE]; Mascheroder Weg 1, D-38124 Braunschweig (DE).</p> <p>(72) Erfinder; und</p> <p>(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): REICHENBACH, Hans [DE/DE]; Mascheroder Weg 1, D-38124 Braunschweig (DE). HÖFLE, Gerhard [DE/DE]; Mascheroder Weg 1, D-38124 Braunschweig (DE). SASSE, Florenz [DE/DE]; Mascheroder Weg 1, D-38124 Braunschweig (DE). STEIN- METZ, Heinrich [DE/DE]; Mascheroder Weg 1, D-38124 Braunschweig (DE).</p> <p>(74) Anwälte: BOETERS, Hans, D. usw.; Boeters & Bauer, Bereiteranger 15, D-81541 München (DE).</p>	<p>(81) Bestimmungsstaaten: AL, AM, AT, AU, AZ, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, HU, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, ARIPO Patent (GH, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG).</p> <p>Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i></p>
<p>(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP97/05095</p> <p>(22) Internationales Anmeldedatum: 17. September 1997 (17.09.97)</p> <p>(30) Prioritätsdaten: 196 38 870.8 23. September 1996 (23.09.96) DE</p> <p>(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): GESELLSCHAFT FÜR BIOTECHNOLOGISCHE FORSCHUNG MBH (GBF) [DE/DE]; Mascheroder Weg 1, D-38124 Braunschweig (DE).</p> <p>(72) Erfinder; und</p> <p>(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): REICHENBACH, Hans [DE/DE]; Mascheroder Weg 1, D-38124 Braunschweig (DE). HÖFLE, Gerhard [DE/DE]; Mascheroder Weg 1, D-38124 Braunschweig (DE). SASSE, Florenz [DE/DE]; Mascheroder Weg 1, D-38124 Braunschweig (DE). STEIN- METZ, Heinrich [DE/DE]; Mascheroder Weg 1, D-38124 Braunschweig (DE).</p> <p>(74) Anwälte: BOETERS, Hans, D. usw.; Boeters & Bauer, Bereiteranger 15, D-81541 München (DE).</p>	<p>(81) Bestimmungsstaaten: AL, AM, AT, AU, AZ, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, HU, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, ARIPO Patent (GH, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG).</p> <p>Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i></p>			
<p>(54) Title: COMPOUNDS WITH ANTIMYCOTIC AND CYTOSTATIC EFFECT, PREPARATION METHOD, AGENT CONTAINING THESE COMPOUNDS AND DSM 11 092</p> <p>(54) Bezeichnung: VERBINDUNGEN MIT ANTIMYKOTISCHER UND CYTOSTATISCHER WIRKUNG, HERSTELLUNGSVERFAHREN, MITTEL UND DSM 11 092</p>				
				
Tubulysin A				
<p>(57) Abstract</p> <p>The invention relates to chemical compounds having antimycotic and cytostatic effect, a method for their preparation from <i>archangium gephyra</i> strain DSM 11 092, agent containing these compounds and said strain.</p>				
<p>(57) Zusammenfassung</p> <p>Die Erfindung betrifft chemische Verbindungen mit antimykotischer und cytostatischer Wirkung, ein Verfahren zu ihrer Gewinnung aus dem <i>Archangium gephyra</i>-Stamm DSM 11 092, Mittel mit den Verbindungen und dem Stamm.</p>				

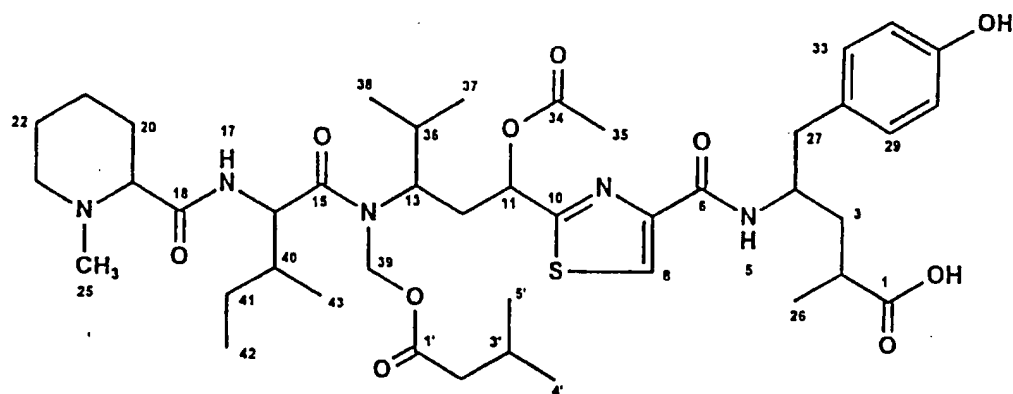
LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

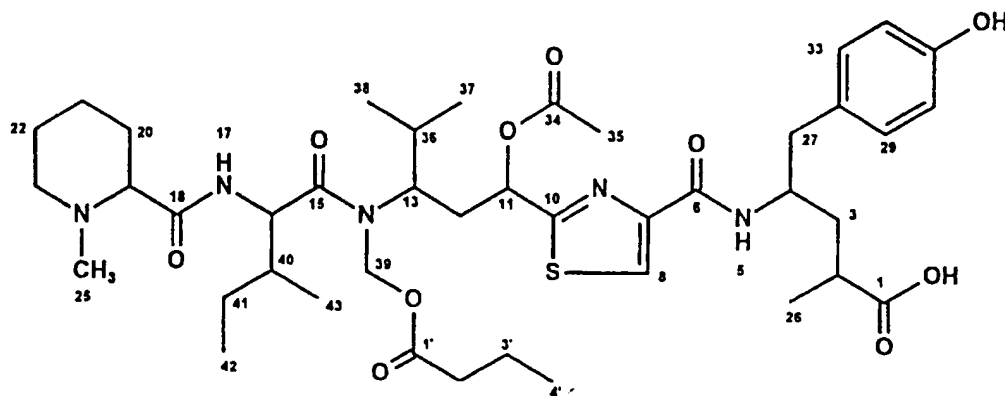
AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidshan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YL	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LJ	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

Verbindungen mit antimykotischer und cytostatischer Wirkung,
Herstellungsverfahren, Mittel und DSM 11 092

Gemäß einer ersten Ausführungsform betrifft die Erfindung eine chemische Verbindung der Formel



Gemäß einer weiteren Ausführungsform betrifft die Erfindung eine chemische Verbindung der Formel



Gemäß einer weiteren Ausführungsform betrifft die Erfindung eine chemische Verbindung der Summenformel $C_{43}H_{65}N_5O_{10}S$ und mit den folgenden Parametern:

1H -NMR-Spektrum gemäß Tabelle 1 (Tubulysin A);

^{13}C -NMR-Spektrum gemäß Tabelle 1 (Tubulysin A);

UV-Spektrum (Methanol) λ_{max} (log epsilon): 225 (4,20), 250 (3,86) und 280 (3,20);

IR-Spektrum (KBr) ν : 3390, 2959, 2934, 2876, 1747, 1667, 1553, 1515 und 1233 cm^{-1} .

Gemäß einer weiteren Ausführungsform betrifft die Erfindung eine chemische Verbindung der Summenformel $C_{42}H_{63}N_5O_{10}S$ und mit den folgenden Parametern

1H -NMR-Spektrum gemäß Tabelle 1 (Tubulysin B);

^{13}C -NMR-Spektrum gemäß Tabelle 1 (Tubulysin B);

UV-Spektrum (Methanol) λ_{max} (log epsilon): 225 (4,23), 250 (3,91) und 280 (3,26);

IR-Spektrum (KBr) ν : 3421, 2964, 2935, 2878, 1742, 1667, 1550, 1517 und 1235 cm^{-1} .

Gemäß einer weiteren Ausführungsform betrifft die Erfindung eine chemische Verbindung der Summenformel $C_{41}H_{61}N_5O_{10}S$ und mit einem R_t -Wert (HPLC) unter folgenden Bedingungen:

Säule: Nucleosil 100 C-18, 7 μ m, 125 x 4 mm;
Laufmittel: Methanol/Wasser = 70/30 + 2 mM Ammoniumacetat (pH 5,0) + 10 mM Natriumdodecylsulfat;
Fluß: 1 ml/min;
Detektion: Diodenarray.

Gemäß einer weiteren Ausführungsform betrifft die Erfindung eine chemische Verbindungen mit antimykotischer und cytotoxischer Wirkung, dadurch gewinnbar, daß man

- (a) *Archangium gephyra* DSM 11 092 in einem wässrigen Kulturmedium mit einem Gehalt an Kohlenstoff-Quellen, Stickstoff-Quellen, Schwefel-Quellen, Cyanocobalamin und Mineralsalzen aerob in Gegenwart eines Adsorberharzes kultiviert und
- (b) das Adsorberharz vom Kulturmedium abtrennt und mit Methanol eluiert und vom Eluat das Methanol abzieht und
- (c) die zurückbleibende Wasserphase mit Ethylacetat extrahiert, den Extrakt einengt und einen Rohextrakt gewinnt und
- (d) den Rohextrakt einer Gelchromatographie mit Methanol als Laufmittel unterwirft und ein oder mehrere Fraktionen mit einem Gehalt an Verbindungen mit antimykotischer und cytostatischer Wirkung im UV bei 226 nm detektiert, abtrennt und einengt,
- (e) das gewonnene Konzentrat an einer Umkehrphase mit Methanol/Ammoniumacetat-Puffer chromatographiert und durch Detektion im UV bei 226 nm
- (e1) eine Fraktion mit einer rascher laufenden Verbindung sowie, zeitlich getrennt,
- (e2) eine Fraktion mit einer langsamer laufenden Verbindung sowie, zeitlich getrennt,
- (e3) eine Fraktion mit einer noch langsamer laufenden Verbindung abtrennt,
- (f) von der gemäß (e1) gewonnenen Fraktion das Methanol abzieht, die zurückbleibende Wasserphase mit Ethylacetat extrahiert, eindampft und trocknet und die Verbindung gewinnt,

(g) von der gemäß (e2) gewonnenen Fraktion das Methanol abzieht, die zurückbleibende Wasserphase mit Ethylacetat extrahiert, eindampft und trocknet und die Verbindung gewinnt und

(h) von der gemäß (e3) gewonnenen Fraktion das Methanol abzieht, die zurückbleibende Wasserphase mit Ethylacetat extrahiert, eindampft und trocknet und die Verbindung gewinnt.

Diese Verbindungen können dadurch gewinnbar sein, daß man bei Stufe (e) an einer C₁₈-Umkehrphase chromatographiert.

Gemäß einer weiteren Ausführungsform betrifft die Erfindung ein Verfahren zur Gewinnung von chemischen Verbindungen mit antimykotischer und cytostatischer Wirkung, dadurch gekennzeichnet, daß man

(a) *Archangium gephyra* DSM 11 092 in einem wässrigen Kulturmedium mit einem Gehalt an Kohlenstoff-Quellen, Stickstoff-Quellen, Schwefel-Quellen, Cyanocobalamin und Mineralsalzen aerob in Gegenwart eines Adsorberharzes kultiviert und

(b) das Adsorberharz vom Kulturmedium abtrennt und mit Methanol eluiert und vom Eluat das Methanol abzieht und

(c) die zurückbleibende Wasserphase mit Ethylacetat extrahiert, den Extrakt einengt und einen Rohextrakt gewinnt und

(d) den Rohextrakt einer Gelchromatographie mit Methanol als Laufmittel unterwirft und ein oder mehrere Fraktionen mit einem Gehalt an Verbindungen mit antimykotischer und cytostatischer Wirkung im UV bei 226 nm detektiert, abtrennt und einengt,

(e) das gewonnene Konzentrat an einer Umkehrphase mit Methanol Ammoniumacetat-Puffer chromatographiert und durch Detektion im UV bei 226 nm

(e1) eine Fraktion mit einer rascher laufenden Verbindung sowie, zeitlich getrennt,

(e2) eine Fraktion mit einer langsamer laufenden Verbindung sowie, zeitlich getrennt,

(e3) eine Fraktion mit einer noch langsamer laufenden Verbindung abtrennt,

- (f) von der gemäß (e1) gewonnenen Fraktion das Methanol abzieht, die zurückbleibende Wasserphase mit Ethylacetat extrahiert, eindampft und trocknet und die Verbindung gewinnt,
- (g) von der gemäß (e2) gewonnenen Fraktion das Methanol abzieht, die zurückbleibende Wasserphase mit Ethylacetat extrahiert, eindampft und trocknet und die Verbindung gewinnt und
- (h) von der gemäß (e3) gewonnenen Fraktion das Methanol abzieht, die zurückbleibende Wasserphase mit Ethylacetat extrahiert, eindampft und trocknet und die Verbindung gewinnt.

Gemäß einer weiteren Ausführungsform betrifft die Erfindung ein antimykotisches Mittel mit einem Gehalt an einer erfindungsgemäßen Verbindung.

Gemäß einer weiteren Ausführungsform betrifft die Erfindung ein cytostatisches Mittel mit einem Gehalt an einer erfindungsgemäßen Verbindung.

Schließlich betrifft eine Ausführungsform der Erfindung *Archangium gephyra* DSM 11 092.

Nachstehend wird die Erfindung durch experimentelle Angaben und 3 Figuren (Strukturformeln) näher erläutert.

A. Produktionsbedingungen

A.1. Produktionsstamm

Das Bakterium *Archangium gephyra* gehört zur Ordnung der Myxococcales (Myxobakterien), Unterordnung Cystobacterineae, Familie Archangiaceae. Der Produktionsstamm *Archangium gephyra* Ar 315 wurde im Februar 1973 von Dr. Reichenbach aus einer Probe von einem Komposthaufen im Botanischen Garten in Freiburg, Deutsch-

land, isoliert. Er wurde 1996 bei der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen (DSM) unter der Nr. DSM 11 092 hinterlegt.

A.2. Stammkultur

Die Stammhaltung erfolgt auf Agarplatten, bevorzugt auf Hefe-Agar (VY/2-Agar). Dieses Medium enthält 0,5 % Bäckerhefe, 0,1 % $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$, 0,1 $\mu\text{g/l}$ Cyanocobalamin und 1,2 % Agar. Der pH-Wert wird auf 7,4 eingestellt. Das Medium wird durch Autoklavieren sterilisiert. Die Plattenkulturen werden bei 30 °C bebrütet.

A.3. Morphologische Beschreibung

Die vegetativen Zellen sind lange, schlanke Stäbchen, etwa 6 bis 9 μm lang und 0,8 μm dick. Bedingt durch die Gleitbewegung der Bakterien, breiten sich die Kolonien rasch über die Kulturplatte aus. Die Schwarmkolonie auf Hefeagar ist dünn, filmartig, rötlich braun. Wie an dem um die Kolonien entstehenden Klärhof zu erkennen, werden die Hefezellen im Medium abgebaut. Auf diesem Medium bildet der Stamm oft blaßbräunliche Fruchtkörper, die aus mäandrierenden Wülsten aufgebaut sind und stark lichtbrechende Myxosporen enthalten. Letztere sind kurze, dicke, etwas unregelmäßige Stäbchen, etwa 2,5 bis 4 μm lang und 1,2 bis 1,8 μm dick.

A.4. Leistungen

Der Stamm Ar 315 produziert Substanzen, nämlich Tubulysine, die das Wachstum von Pilzen, humanen Krebszellen und anderen tierischen Zellkulturen hemmen. Die Hemmstoffe können sowohl aus den Zellen wie auch aus dem Kulturüberstand isoliert werden.

A.5. Produktion der Tubulysine

Die Substanzen werden während der logarithmischen bis hin zur stationären Wachstumsphase produziert. Eine typische Ferment-

tation verläuft wie folgt: Ein Fermentor mit 350 l Arbeitsvolumen wird mit 300 l Kulturmedium gefüllt (Zusammensetzung: 0,5 % Probion (Einzellerprotein der Fa. Hoechst); 1,0 % Stärke (Cerestar Krefeld); 0,2 % Glucose; 0,1 % Hefeextrakt; 0,1 % $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$; 0,1 % $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$; 0,1 $\mu\text{g/l}$ Cyanocobalamin; Alternativen zu Probion sind Sojamehl oder Maiskleber). Der pH-Wert wird mit KOH auf 7,4 eingestellt. Zur Bindung der ins Medium freigesetzten Hemmstoffe wird dem Medium 1 % (V/V) eines Adsorberharzes (Amberlite XAD-16, Rohm & Haas) zugesetzt. Beimpft wird mit 10 l einer 3 Tage alten Vorkultur, die im gleichen Medium in einem entsprechend kleineren Fermentor erzeugt wurde. Fermentiert wird bei 30 °C mit einer Rührgeschwindigkeit von 150 U/min und einer Belüftungsrate von 10 Vol.-% pro min. Anfängliche Schaumbildung wird durch Zugabe von 50 ml Silikon-Antischaum (z. B. Tegosipon, Goldschmidt AG, Essen) verhindert. Der pH-Wert steigt im Laufe der Fermentation an. Der Anstieg wird durch Zugabe von 5-proz. Schwefelsäure auf 7,8 begrenzt. Die Fermentation wird nach 5 Tagen beendet.

B. Isolierung von Tubulysin A, B und C

Das Adsorberharz wird in einem Prozeßfilter (0,7 m², 100 Maschen (mesh)) von der Kultur abgetrennt, und mit 15 l Methanol im Verlauf von 3 h eluiert. Die Konzentration des Eluates erfolgt unter Vakuum bis zum Auftreten der Wasserphase, die anschließend dreimal mit Ethylacetat extrahiert wird. Nach Einengen der organischen Phase im Vakuum bei 30 °C Badtemperatur erhält man 36 g Rohextrakt.

Dieser Rohextrakt wird durch LH-20-Gelchromatographie (Säule: d = 20 cm, l = 100 cm, Fluß 45 ml/min, Detektion 226 nm) mit dem Laufmittel Methanol nach UV-Banden in 6 Fraktionen aufgetrennt, wobei Tubulysin A, B und C in der 2. Fraktion von 110 bis 130

min enthalten sind. Nach Einengen der betreffenden Fraktion trennt man in 3 Portionen auf einer Eurosil-Bioselect (100-20-C-18)-Säule (d = 4 cm, l = 48 cm) mit dem Laufmittel Methanol/0,05 M Ammoniumacetat-Puffer (pH 7,0) = 60/40 und einem Fluß von 8 ml/min. Die Detektion erfolgt bei 226 nm. R_t Tubulysin C 245 bis 260, Tubulysin B 260 bis 285 min, Tubulysin A 300 bis 320 min.

Nach Eindampfen der vereinigten Tubulysin A, Tubulysin B und Tubulysin C enthaltenen Fraktionen bis zur Wasserphase extrahiert man mit Ethylacetat und erhält nach dem Eindampfen im Vakuum und Trocknen 420 mg Tubulysin A, 240 mg Tubulysin B und 20 mg Tubulysin C.

Tubulysin A

$C_{43}H_{65}N_5O_{10}S$ [843]

DCI-MS (positiv-Ionen): 844.4543 für $[M+H]^+$

1H - und ^{13}C -NMR siehe Tabellen 1 und 2

UV (Methanol) λ_{max} (log epsilon) = 225 (4.20); 250 (3.86);
280 (3.30)

IR KBr: ν = 3390; 2959; 2934; 2876; 1747; 1667; 1553; 1515;
1233 cm^{-1}

DC: R_f = 0.27

DC-Alufolie 60 F₂₅₄ Merck. Laufmittel: Dichlormethan/Methanol =
9:1

Detektion: UV-Löschung bei 254 nm

HPLC: R_t = 9.7 min

Säule: Nucleosil 100 C-18 7 μm , 125 x 4 mm

Laufmittel: Methanol/Wasser = 70/30 + 2mM Ammoniumacetat (pH 5.0)
+ 10 mM Natrium-dodecylsulfat

Fluß: 1 ml/min

Detektion: Diodenarray

Tubulysin B

$C_{42}H_{63}N_5O_{10}S$ [829]

DCI-MS (positiv-Ionen): 830.4361 für $[M+H]^+$

1H - und ^{13}C -NMR siehe Tabellen 1 und 2

UV (Methanol) λ_{max} (log epsilon) = 225 (4.23); 250 (3.91);
280 (3.26)

IR KBr: ν = 3421; 2964; 2935; 2878; 1742; 1667; 1550; 1517;
1235 cm^{-1}

DC: R_f = 0.25

DC-Alufolie 60 F₂₅₄ Merck. Laufmittel: Dichlormethan/Methanol =
9:1

Detektion: UV-Löschung bei 254 nm

HPLC: R_t = 7.3 min

Säule: Nucleosil 100 C-18 7 μm , 125 x 4 mm

Laufmittel: Methanol/Wasser = 70/30 + 2 mM Ammoniumacetat (pH 5.0)
+ 10 mM Natrium-dodecylsulfat

Fluß: 1 ml/min

Detektion: Diodenarray

Tubulysin C

$C_{41}H_{61}N_5O_{10}S$ [815]

ESI-MS (positiv-Ionen): 816.6 für [M+H]

HPLC: R_t = 6.8 min

Säule: Nucleosil 100 C-18 7 μm , 125 x 4 mm.

Laufmittel: Methanol/Wasser = 70/30 + 2 mM Ammoniumacetat (pH 5,0)
+ 10 mM Natrium-dodecylsulfat

Fluß: 1 ml/min

Detektion: Diodenarray

Tabelle 1 ¹H-NMR data of tubulysines in [D₆] DMSO (600 MHz)

H	Tubulysin A			Tubulysin B		
	δ _H	m	J[Hz]	δ _H	m	J[Hz]
2-H	2.37	m		2.39	m	
3-H _a	1.57	m		1.55	m	
3-H _b	1.83	m		1.82	m	
4-H	4.10	m		4.11	m	
5-H	7.88	d	7.5	7.76	d	9.0
8-H	8.18	s		8.17	s	
11-H	5.74	dd	11.3, 1.4	5.75	dd	11.2, 1.6
12-H _a	2.09	m		2.08	m	
12-H _b	2.36	m		2.36	m	
13-H	4.35	m		4.35	m	
16-H	4.40	dd	9.0, 8.8	4.42	dd	9.0, 8.8
17-H	7.92	d	8.8	7.88	d	8.6
19-H	2.46	dd	7.6	2.47	m	
20-H _a	1.42	m		1.42	m	
20-H _b	1.51	m		1.52	m	
21-H _a	1.15	dd	12.5	1.16	m	
21-H _b	1.62	m	12.6	1.62	m	
22-H _a	1.36	m		1.38	m	
22-H _b	1.53	m		1.53	m	
23-H _a	1.94	m		1.93	m	
23-H _b	2.82	dd	11.4	2.83	dd	11.3
25-H ₃	2.04	s		2.05	s	
26-H ₃	1.04	d	7.0	1.05	d	7.0
27-H _a	2.66	m		2.68	m	
27-H _b	2.73	m		2.71	m	
29-H	6.96	d	8.4	6.96	d	8.4
30-H	6.61	d	8.4	6.62	d	8.3

32-H	6.61	d	8.4	6.62	d	8.3
33-H	6.96	d	8.4	6.96	d	8.4
35-H ₃	2.10	s		2.11	s	
36-H	1.82	m		1.84	m	
37-H ₃	0.67	d	6.5	0.68	d	6.6
38-H ₃	0.97	d	6.5	0.97	d	6.4
39-H _a	5.26	d	12.0	5.27	d	12.0
39-H _b	6.19	d	12.0	6.20	d	12.0
40-H	1.93	m		1.95	m	
41-H _a	1.08	m		1.10	m	
41-H _b	1.49	m		1.49	m	
42-H ₃	0.81	t	7.5	0.80	t	7.4
43-H ₃	0.81	d	7.1	0.80	d	7.0
2'-H _a	2.13	m		2.15	m	
2'-H _b	2.15	m		2.18	m	
3'-H _a	1.92	m		1.48	m	
3'-H _b	-			1.50	m	
4'-H ₃	0.82	d	6.9	0.82	t	7.0
5'-H ₃	0.81	d	6.8			

Tabelle 2 ^{13}C -NMR data of tubulysines in $[\text{D}_6]$ DMSO (600 MHz)

C	Tubulysin A		Tubulysin B	
	δ_{c}	m	δ_{c}	m
1	177.1	s	177.0	s
2	36.2	d	36.0	d
3	37.6	t	37.6	t
4	49.0	d	48.9	d
6	159.7	s	159.7	s
7	149.8	s	149.7	s
8	124.2	d	124.1	s
10	168.5	s	168.7	s
11	68.8	d	69.0	d
12	34.3	t	34.4	t
13	55.8 *	d	55.6 *	d
15	174.2	s	174.2	s
16	52.6	d	52.6	d
18	172.8	s	172.8	s
19	68.1	d	68.0	d
20	24.8	t	24.8	t
21	22.8	t	22.7	t
22	29.6	t	29.5	t
23	54.7	t	54.6	t
25	43.8	q	43.7	q
26	18.0	q	17.9	q
27	39.5	t	39.4	t
28	128.5	s	128.4	s
29	129.9	d	129.9	d
30	114.9	d	114.9	d
31	155.5	s	155.5	s
32	114.9	d	114.9	d

33	129.9	d	129.9	d
34	169.8	s	169.7	s
35	20.5	q	20.4	q
36	30.0	d	30.0	d
37	19.3	q	19.3	q
38	20.2	q	20.2	q
39	68.9 *	t	68.9 *	t
40	35.1	d	35.1	d
41	24.1	t	24.0	t
42	10.0	q	10.0	q
43	15.3	q	15.3	q
1'	171.3	s	171.8	s
2'	42.7	t	35.5	t
3'	25.0	d	17.6	t
4'	22.0	q	10.7	q
5'	22.0	q		

* δ_c gemessen bei 80° C

C. Wirkung

Die Tubulysine haben eine cytostatische Wirkung auf Pilze, humane Krebszelllinien und andere tierische Zellkulturen (vgl. Tabelle). Sie führen in den Zellen zu einem raschen Abbau des Mikrotubuli-Gerüsts. Das Aktinskelett bleibt erhalten. Adhärent wachsende L929-Maus-Zellen vergrößern unter dem Einfluß der Tubulysine ihr Zellvolumen, ohne sich zu teilen, und entwickeln große Zellkerne, die dann in einem apoptotischen Vorgang zerfallen.

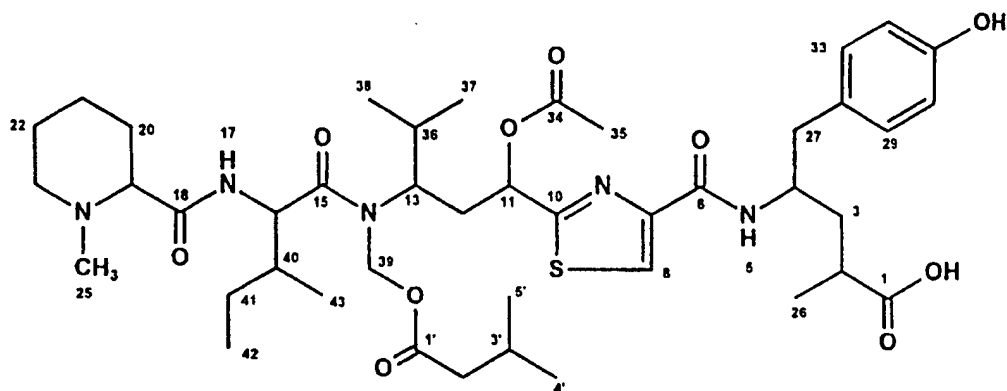
Wirkungsspektrum		
Pilze	Hemmhof [mm]	
	Tubulysin A	Tubulysin B
<i>Aspergillus niger</i>	20	18
<i>Botrytis cinerea</i>	23	18
<i>Coprinus cinereus</i>	20	
<i>Pythium debaryanum</i>	20	

Agardiffusionstest: 20 µg pro Testblättchen von 6 mm Durchmesser

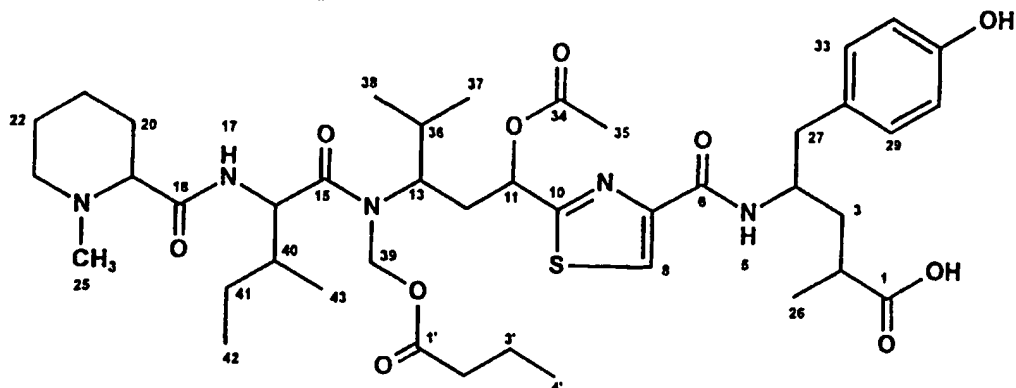
Humane Krebszelllinien	IC ₅₀ [ng/ml]		
	Tubulysin A	Tubulysin B	Tubulysin C
KB-3-1 (DSM ACC 158)	0,01	0,02	0,1
K-562 (ATCC CCL 243)	0,1	0,2	1,5
HL-60 (ATCC CCL 240)	0,04	0,08	0,4
Tierische Zelllinien			
L929, Maus (ATCC CCL 1)	0,2	0,4	2
Pt K2, <i>Potorous tri-</i> <i>dactylis</i> (ATCC CCL 56)	0,2	0,2	2

Patentansprüche

1. Chemische Verbindung der Formel



2. Chemische Verbindung der Formel

3. Chemische Verbindung der Summenformel $C_{43}H_{65}N_5O_{10}S$ und mit den folgenden Parametern: 1H -NMR-Spektrum gemäß Tabelle 1 (Tubulysin A); ^{13}C -NMR-Spektrum gemäß Tabelle 1 (Tubulysin A);UV-Spektrum (Methanol) λ_{max} (log epsilon): 225 (4,20), 250 (3,86) und 280 (3,20);IR-Spektrum (KBr) ν : 3390, 2959, 2934, 2876, 1747, 1667, 1553, 1515 und 1233 cm^{-1} .4. Chemische Verbindung der Summenformel $C_{42}H_{63}N_5O_{10}S$ und mit den folgenden Parametern 1H -NMR-Spektrum gemäß Tabelle 1 (Tubulysin B); ^{13}C -NMR-Spektrum gemäß Tabelle 1 (Tubulysin B);UV-Spektrum (Methanol) λ_{max} (log epsilon): 225 (4,23), 250 (3,91) und 280 (3,26);IR-Spektrum (KBr) ν : 3421, 2964, 2935, 2878, 1742, 1667, 1550, 1517 und 1235 cm^{-1} .5. Chemische Verbindung der Summenformel $C_{41}H_{61}N_5O_{10}S$ und mit einem R_t -Wert (HPLC) unter folgenden Bedingungen:Säule: Nucleosil 100 C-18, 7 μm , 125 x 4 mm;

Laufmittel: Methanol/Wasser = 70/30 + 2 mM Ammoniumacetat (pH 5,0) + 10 mM Natriumdodecylsulfat;

Fluß: 1 ml/min;

Detektion: Diodenarray.

6. Chemische Verbindungen mit antimykotischer und cytotoxischer Wirkung, dadurch gewinnbar, daß man

(a) *Archangium gephyra* DSM 11 092 in einem wässrigen Kulturmedium mit einem Gehalt an Kohlenstoff-Quellen, Stickstoff-Quellen, Schwefel-Quellen, Cyanocobalamin und Mineralsalzen aerob in Gegenwart eines Adsorberharzes kultiviert und

(b) das Adsorberharz vom Kulturmedium abtrennt und mit Methanol eluiert und vom Eluat das Methanol abzieht und

(c) die zurückbleibende Wasserphase mit Ethylacetat extrahiert, den Extrakt einengt und einen Rohextrakt gewinnt und

(d) den Rohextrakt einer Gelchromatographie mit Methanol als Laufmittel unterwirft und ein oder mehrere Fraktionen mit einem Gehalt an Verbindungen mit antimykotischer und cytostatischer Wirkung im UV bei 226 nm detektiert, abtrennt und einengt,

(e) das gewonnene Konzentrat an einer Umkehrphase mit Methanol/Ammoniumacetat-Puffer chromatographiert und durch Detektion im UV bei 226 nm

(e1) eine Fraktion mit einer rascher laufenden Verbindung sowie, zeitlich getrennt,

(e2) eine Fraktion mit einer langsamer laufenden Verbindung sowie, zeitlich getrennt,

(e3) eine Fraktion mit einer noch langsamer laufenden Verbindung abtrennt,

(f) von der gemäß (e1) gewonnenen Fraktion das Methanol abzieht, die zurückbleibende Wasserphase mit Ethylacetat extrahiert, eindampft und trocknet und die Verbindung gewinnt,

(g) von der gemäß (e2) gewonnenen Fraktion das Methanol abzieht, die zurückbleibende Wasserphase mit Ethylacetat extrahiert, eindampft und trocknet und die Verbindung gewinnt und

(h) von der gemäß (e3) gewonnenen Fraktion das Methanol abzieht, die zurückbleibende Wasserphase mit Ethylacetat extrahiert, eindampft und trocknet und die Verbindung gewinnt.

7. Chemische Verbindungen nach Anspruch 5, dadurch gewinnbar, daß man bei Stufe (e) an einer C₁₈-Umkehrphase chromatographiert.

8. Verfahren zur Gewinnung von chemischen Verbindungen mit antimykotischer und cytostatischer Wirkung, dadurch gekennzeichnet, daß man

(a) *Archangium gephyra* DSM 11 092 in einem wässrigen Kulturmedium mit einem Gehalt an Kohlenstoff-Quellen, Stickstoff-Quellen, Schwefel-Quellen, Cyanocobalamin und Mineralsalzen aerob in Gegenwart eines Adsorberharzes kultiviert und

(b) das Adsorberharz vom Kulturmedium abtrennt und mit Methanol eluiert und vom Eluat das Methanol abzieht und

(c) die zurückbleibende Wasserphase mit Ethylacetat extrahiert, den Extrakt einengt und einen Rohextrakt gewinnt und

(d) den Rohextrakt einer Gelchromatographie mit Methanol als Laufmittel unterwirft und ein oder mehrere Fraktionen mit einem Gehalt an Verbindungen mit antimykotischer und cytostatischer Wirkung im UV bei 226 nm detektiert, abtrennt und einengt,

(e) das gewonnene Konzentrat an einer Umkehrphase mit Methanol Ammoniumacetat-Puffer chromatographiert und durch Detektion im UV bei 226 nm

(e1) eine Fraktion mit einer rascher laufenden Verbindung sowie, zeitlich getrennt,

(e2) eine Fraktion mit einer langsamer laufenden Verbindung sowie, zeitlich getrennt,

(e3) eine Fraktion mit einer noch langsamer laufenden Verbindung abtrennt,

(f) von der gemäß (e1) gewonnenen Fraktion das Methanol abzieht, die zurückbleibende Wasserphase mit Ethylacetat extrahiert, eindampft und trocknet und die Verbindung gewinnt,

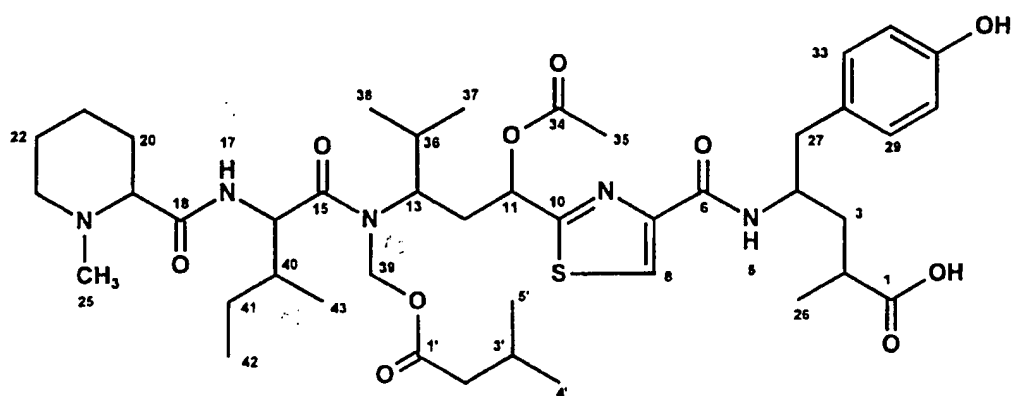
(g) von der gemäß (e2) gewonnenen Fraktion das Methanol abzieht, die zurückbleibende Wasserphase mit Ethylacetat extrahiert, eindampft und trocknet und die Verbindung gewinnt und

(h) von der gemäß (e3) gewonnenen Fraktion das Methanol abzieht, die zurückbleibende Wasserphase mit Ethylacetat extrahiert, eindampft und trocknet und die Verbindung gewinnt.

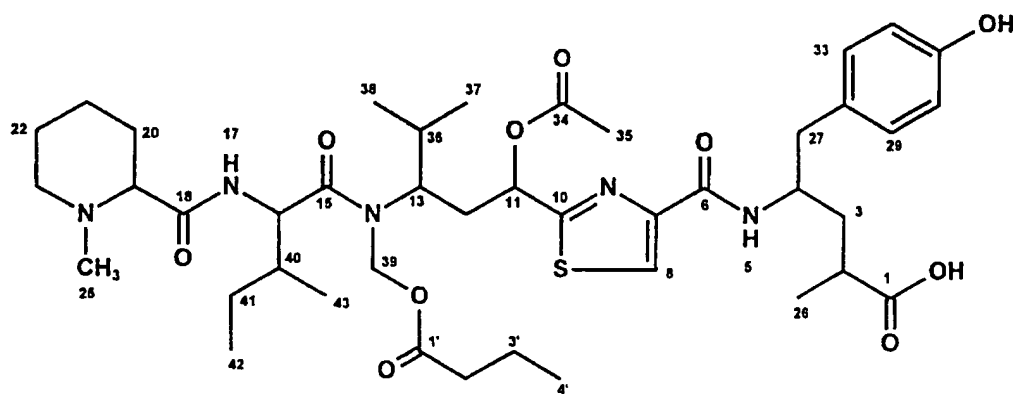
9. Antimykotisches Mittel mit einem Gehalt an einer Verbindung gemäß einem der Ansprüche 1 bis 7.

10. Cytostatisches Mittel mit einem Gehalt an einer Verbindung gemäß einem der Ansprüche 1 bis 7.

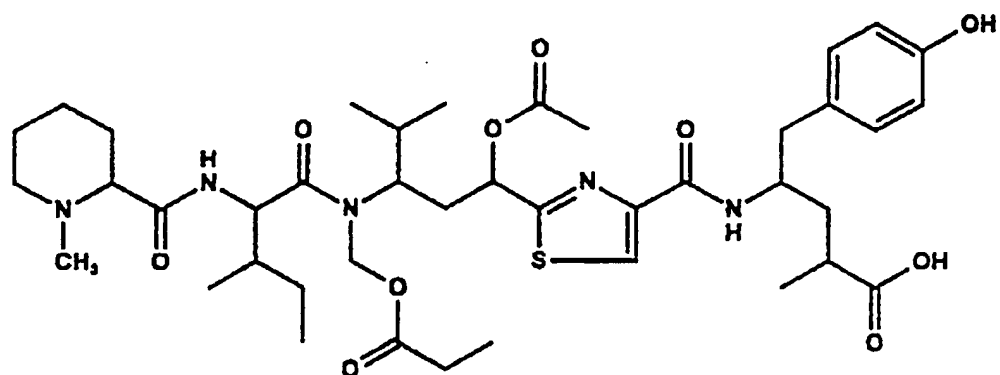
11. *Archangium gephyra* DSM 11 092.



Tubulysin A



Tubulysin B



Tubulysin C

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 97/05095

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 C07K5/078 C12P1/04 C12R1/01 A61K38/05 C12N1/20
 //(C12P1/04,C12R1:01)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C07K C12P C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 93 13094 A (BIOTECHNOLOG FORSCHUNG GMBH) 8 July 1993 ---	
A	F. SASSE ET AL: "Gephyronic acid, a novel inhibitor of Eukariotic protein synthesis from Archangium gephyra" THE JOURNAL OF ANTIBIOTICS, vol. 48, no. 1, 1995, pages 21-25, XP002051795 -----	

☐ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "Δ" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

13 January 1998

Date of mailing of the international search report

26/01/1998

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
 Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Cervigni, S

Information on patent family members

PCT/EP 97/05095

13-05-93
28-07-93

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 97/05095

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 6 C07K5/078 C12P1/04 C12R1/01 A61K38/05 C12N1/20
 //(C12P1/04,C12R1:01)

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 6 C07K C12P C12N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
------------	--	--------------------

A	WO 93 13094 A (BIOTECHNOLOG FORSCHUNG GMBH) 8.Juli 1993 ----	
A	F. SASSE ET AL: "Gephyronic acid, a novel inhibitor of Eukariotic protein synthesis from Archangium gephyra" THE JOURNAL OF ANTIBIOTICS, Bd. 48, Nr. 1, 1995, Seiten 21-25, XP002051795 -----	

☐ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhafte erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"Z" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

13. Januar 1998

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

26/01/1998

Name und Postanschrift der internationalen Recherchenbehörde
 Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
 Fax: (+31-70) 340-3018

Bevollmächtigter Bediensteter

Cervigni, S

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 97/05095

Im Recherchenbericht angeführtes Patentedokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9313094 A	08-07-93	DE 4142951 C AU 3257793 A	13-05-93 28-07-93
